**ARÉA TEMÁTICA: Taxonomia**

**Taxonomia iterativa na resolução de incertezas taxonômicas em anfípodes troglóbios do gênero Potiberaba Fišer, 2013 em cavernas da Caatinga**

Matheus Arthur Lúcio da Rocha¹, Diego de Medeiros Bento², Rodrigo Lopes Ferreira³, Sergio Maia Queiroz Lima¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande Do Norte (UFRN), Campus Natal. E-mail: matheusarthurrocha@outlook.com smaialima@gmail.com

 ² Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio).E-mail:

 diego.bento@icmbio.gov.br

 ³ Universidade Federal de Lavras (UFLA)

 drops@ufla.br

**INTRODUÇÃO**

Cavernas são cavidades naturais formadas através da ação química ou mecânica na rocha matriz. Os sistemas subterrâneos (ambientes hipógeos) se distinguem do ambiente superficial (epígeo) pela ausência total de luz em zonas profundas, e estabilidade ambiental, em aspectos como temperatura e umidade (Culver 1982, Jones 1992).

Estes ambientes são ocupados por organismos especializados, conhecidos como troglóbios (Ferreira *et al*. 2010). Estes, apresentam modificações ecológicas, morfológicas e genéticas que os permitem sobreviver nestes ambientes (Kury *et al*. 1997). No brasil, este grupo é amplamente representado em todas as regiões, em cavernas dos mais diversos tipos de composição mineral, em especial, por insetos e crustáceos (Silveira *et al.* 2009). Atualmente, a região nordeste com ênfase no estado do Rio Grande do Norte (RN), vem se destacando quanto ao número de novas espécies de invertebrados troglóbios descritas, como o gênero de anfípodes Potiberaba, descrito em 2013 por Fišer e colaboradores, sendo *Potiberaba porakuara* a única espécie descrita até então.

Até 2022, acreditava-se que *P. porakuara* era uma espécie amplamente distribuída nas cavernas da região, inseridas dentro da formação do calcário Jandaíra, região Oeste do RN. Entretanto, através de investigações utilizando o marcador mitocondrial *COXI*, um estudo realizado em 2022 por Bento *et al*. indicou a possibilidade de *P. porakuara* ser um complexo com pelo menos 5 espécies distintas. Desse modo, novas expedições foram realizadas ao conjunto de cavernas, aumentando assim o número amostral de indivíduos para posteriores investigações moleculares e morfológicas, podendo assim, testar a hipótese da presença de um complexo de espécies dentro do gênero Potiberaba, e se comprovada, utilizar as informações morfológicas e genéticas para descrição das novas espécies.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Os espécimes foram coletados em um conjunto de cavernas na formação do calcário Jandaíra, Oeste do RN. Para obtenção dos espécimes, foi utilizado um puçá de tela e piceta. Todos foram fixados em solução de etanol 100% e identificados segundo Fišer *et al.* (2013). Em seguida, as amostras foram subdivididas, separando animais para análises morfológicas e moleculares.

O DNA foi extraído de indivíduos de cada linhagem de Potiberaba identificada por Bento *et al* (2022) para ambos os marcadores, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Foram obtidas sequências parciais do gene mitocondrial *COXI* e do nuclear *28S*. Para ambos, a PCR seguiu os parâmetros descritos em Bento *et al* (2022). Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose e utilizados em uma PCR de sequenciamento. Após a edição dos eletroferogramas, as sequências consenso foram alinhadas no MEGA 7.0. A partir da análise de distribuição de haplótipos feita no DNAsp v.5 (Librado & Rozas 2009) foi construída uma rede de haplótipos no PopArt (Leigh & Bryant 2015).

 Para detectar a estrutura populacional das linhagens utilizamos o Geneland no software R v. 3. 1. 4. A análise Geneland foi baseada em um modelo de frequência não correlacionado, com número populacional mínimo 1 e máximo 10. O modelo espacial foi selecionado para inferir o número de clusters em nove rodadas independentes usando 1.000.000 de iterações MCMC. Posteriormente um burn-in de 200 foi aplicado e a corrida com o logaritmo médio mais alto de probabilidade posterior foi usada para calcular as probabilidades posteriores das populações.

As inferências Bayesianas (BI) foram realizadas no \*BEAST v. 2.1, utilizando os parâmetros: modelo de substituição HKY+G. Relógio relaxado com taxa de distribuição normal, média de 0,01, taxa de substituição de 0,07% M.a para *COXI* e 0,035% M.a para *28S* (Regier et al. 2005, Lins et al. 2015), e desvio padrão de 0,001. O modelo anterior da árvore foi definido como especiação com processo de Yule. A cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi executada com 20.000.000 gerações. Em seguida, treeAnnotator v. 1.10.2 foi usado para resumir os resultados do BEAST em uma única árvore com burn-in de 20% e um limite de probabilidade posterior de 0,5. Por fim a árvore final foi visualizada e editada em FigTree v. 1.4.4 (Rambaut 2018).

Para as delimitações de linhagens, os genes foram submetidos a quatro delimitações: ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), GMYC (Generalized Mixed Yule-Coalescent), PTP (Poisson Tree Process) e BPP (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography) (Yang et al. 2015). Uma árvore de máxima verossimilhança gerada no MEGA 7.0, usada como entrada para PTP, utilizando os parâmetros padrão. Árvores ultramétricas geradas no BEAST por BI a partir do conjunto multiloci foram entrada para as delimitações do GMYC. As análises baseadas em distância foram realizadas através do (https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html), com a largura de lacuna relativa de 1,0.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As redes haplótipos geradas para ambos os genes, constituem os primeiros indícios de que a hipótese de um complexo de espécies pode ser verdadeira. Para ambos os genes, as localidades onde os indivíduos foram identificados por Bento *et al* (2022) através do COXI como *P. porakuara*, apresentam ampla diversidade e amplo compartilhamento de haplótipos, e poucos passos mutacionais entre as populações, sugerindo possível conectividade entre as mesmas. Já as outras quatro localidades, apresentam apenas um haplótipo cada, e elevado número de passos mutacionais entre elas, e as localidades de *P. porakuara*, indicando isolamento a tempo suficiente para que mutações pudessem surgir e serem fixadas.

O Geneland recuperou estruturação para cinco linhagens (K= 5), corroborando a hipótese de um complexo de espécies para o gênero. As topologias recuperadas através das árvores inferência bayesianas divergiram entre genes em pontos como: suporte dos ramos, e relações de parentesco entre as quatro linhagens de Potiberaba e *P. porakuara*. A topologia recuperada para o gene *COXI*, indicou que *P. porakuara*, assim como Potiberaba sp. nov. 1, 2, 3 e 4, formam clados monofiléticos, com altos valores de suporte (acima de 90%) para os ramos, exceto para Potiberaba sp. nov. 1. Tal resultado vai de encontro ao que foi proposto por Bento *et al* (2022), onde o mesmo marcador já havia indicado a presença de mais de uma espécie ao longo da distribuição de *P. porakuara*, através do incremento de sequencias da atuais e de novas populações, as divergências entre os grupos foram acentuadas.

 Para o gene nuclear *28S*, os clados que foram recuperados de modo geral não apresentaram suportes considerados significativos (acima de 0.90), exceto para separação de Potiberaba sp. nov. 3 dos outros grupos. Diferenças entre topologias e delimitações de linhagens entre marcadores de origens diferentes, como observado em Potiberaba sp. nov. 4 é algo recorrente (Esmaeili *et al.* 2015), uma vez que, genes nucleares e mitocondriais apresentam características evolutivas distintas ( Campilo *et al*. 2019). Marcadores nucleares necessitam de mais tempo para que mutações surjam e sejam fixadas, quando comparados com marcadores mitocondriais, necessitando de mais tempo para atingir o monofiletismo recíproco, recuperando principalmente eventos antigos de divergência (Galtier *et al.* 2009, Mandal *et al.* 2014, Weigert *et al.* 2016, Allio *et al.* 2017), o que se acredita não ser aplicado a Potiberaba sp. nov. 4.

As delimitações de linhagens de Potiberaba, para o gene mitocondrial *COXI* foram congruentes, exceto para ABGD, indicando a existência de quatro linhagens. Já para o *28S*, os métodos não delimitaram Potiberaba sp. nov. 4 como uma linhagem distinta, sugerindo a existência de quatro, incluindo Potiberaba sp. nov. 4 dentro de *P. porakuara*. Similar ao que foi observado no Geneland, a inclusão de Potiberaba sp. nov. 4 dentro do clado de *P.porakuara* pode ser reflexo de um processo de especiação recente de Potiberaba sp. nov. 4, uma vez que, diferente das novas linhagens, Potiberaba sp. nov. 4 ocorre dentro da área de distribuição de *P.porakuara* entretanto, numa região que não permite fluxo de indivíduos com populações de *P. porakuara* potencializando processos de especiação, dessa forma, a linhagem foi descrita como uma nova espécie, assim como Potiberaba sp. nov. 1, 2 e 3.

**CONCLUSÕES**

O presente estudo ressaltou como a utilização de diferentes marcadores moleculares pode ser útil para resoluções de incertezas taxonomias, com implicações diretas em áreas como a taxonomia, proporcionando a descrição de novas espécies, bem como no âmbito da conservação, uma vez que, através do mesmo, foi possível entender a real distribuição de cada espécie, e assim, fornecer subsídios para posteriores ações de conservação. Além disso, o trabalho se mostra relevante ao indicar que a biodiversidade subterrânea da Caatinga pode esta sendo subestimada, quando apenas uma ferramenta é utilizada para detecção de espécies, necessitando cada vez mais da utilização da chamada taxonomia iterativa, agregando diferentes ferramentas analíticas para resultados cada vez mais robustos.

**REFERÊNCIAS**

Allio, R.; Stefano, D.; Nicolas, G.; Benoit, N. 2017. "Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker." Molecular Biology and Evolution, 11 (2): 2762-2772.

Campillo, L.C.; Kevin, J.B.; Robert, G.M.; Joseph, D. 2019. Manthey. "Mitochondrial genomes of the bird genus Piranga: Rates of sequence evolution, and discordance between mitochondrial and nuclear markers." Mitochondrial DNA Part B 4, 2 (6): 2566-2569.

Culver D.C. 1982. Cave Life. Evolution and Ecology: Cambridge, Harvard University Press.

Esmaeili-Rineh, S.; Alireza, S.; Teo, D.; Ajda, M.; Cene, F. 2015. "Molecular phylogeny of the subterranean genus Niphargus (Crustacea: Amphipoda) in the Middle East: a comparison with European Niphargids." Zoological Journal of the Linnean Society, 4 (175): 812-826.

Ferreira, R.L. 2010. Fauna subterrânea do estado do Rio Grande do Norte: caracterização e impactos. Revista Brasileira de Espeleologia, 1 (1): 25-51.

Fiser, C.; Zagmajster, M.; Ferreira, R.L. 2013. Two new Amphipod families recorded in South America shed light on an old biogeographical enigma. Systematics and Biodiversity, 11 (2): 117-139.

Galtier, N.; Benoit, N. S.; Glémin G.D.D. 2009. "Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal." Molecular ecology, 18 (22): 4541-4550.

Jones R.; Culver D.C.; Kane T.C. 1992. Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressures? Evolution, 46 (4): 353–365.

Kury, L.A.S.; Trajano, E. 1997. Estudo sistemático dos Oniscidea (Crustacea, Isopoda) cavernícolas brasileiros.

Leigh J.W.; Bryant D. 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, 4 (6): 1110–1116.

Lins, L.; Simon, Y.W.; Nathan, L.O. 2017. An evolutionary timescale for terrestrial isopods and a lack of molecular support for the monophyly of Oniscidea (Crustacea: Isopoda). Organisms Diversity & Evolution, 17 (4): 813-820.

Mandal, S.; Liansangmawii, C.; Guruswami, G.; Nachimuthu, S.K. 2014. "Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects–A Review." DNA Barcodes, 1 (2): 1-9.

Regier, J.C.; Shultz, J.W.; Kambic, R.E. 200). Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 272 (561): 395-401.

Silveira, F.A. 2009. Diversidade de invertebrados terrestres. Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais—subsídios ao Programa Biota Minas. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 622: 123-159.

Winger, B.M.; Bates, J.M. 2015. The tempo of trait divergence in geographic isolation: Avian speciation across the Marañon Valley of Peru. Evolution, 69 (3): 772–787.